

2405

NINA Rapport

## Spissnutefrosken i Vestby kommune

Betydning av genetisk struktur og soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ved etablering av nye ynglelokaliteter

Annette Taugbøl  
Jeroen van der Kooij  
Hege Brandsegg  
Merethe Spets  
Børre K. Dervo



## **NINAs publikasjoner**

### **NINA Rapport**

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på engelsk, som NINA Report.

### **NINA Temahefte**

Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. Heftene har vanligvis en populærvitenskapelig form med vekt på illustrasjoner. NINA Temahefte kan også utgis på engelsk, som NINA Special Report.

### **NINA Fakta**

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

### **Annen publisering**

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler og i populærfaglige bøker og tidsskrifter.

# Spissnutefrosken i Vestby kommune

Betydning av genetisk struktur og soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ved etablering av nye ynglelokaliteter

Annette Taugbøl  
Jeroen van der Kooij  
Hege Brandsegg  
Merethe Spets  
Børre K. Dervo

Taugbøl, A., van der Kooij, J., Brandsegg, H., Spets, M. & Dervo B.K. 2024. Spissnutefrosken i Vestby Kommune. Betydning av genetisk struktur og soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ved etablering av nye yngellokaliteter. NINA Rapport 2405. Norsk institutt for naturforskning.

Lillehammer, Januar 2024

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-5213-3

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Stein Ivar Johnsen

ANSVARLIG SIGNATUR

Kristin Evensen Mathiesen

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Vestby Kommune

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Cathrine Sussane Torjussen og Ragnar Joakim Nese

FORSIDEBILDE

Felt og frosk © *Jeroen van der Kooij*.

NØKKEWORD

Amfibier

Rødløst

Populasjoner

Dammer

Utbygging

KONTAKTOPPLYSNINGER

**NINA hovedkontor**  
Postboks 5685 Torgarden  
7485 Trondheim  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Oslo**  
Sognsveien 68  
0855 Oslo  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Tromsø**  
Postboks 6606 Langnes  
9296 Tromsø  
Tlf: 77 75 04 00

**NINA Lillehammer**  
Vormstuguvegen 40  
2624 Lillehammer  
Tlf: 73 80 14 00

**NINA Bergen**  
Thormøhlens gate 55  
5006 Bergen  
Tlf: 73 80 14 00

[www.nina.no](http://www.nina.no)

## Sammendrag

Taugbøl, A., van der Kooij, J., Brandsegg, H., Spets, M. & Dervo B.K. 2024. Spissnutefrosken i Vestby Kommune. Betydning av genetisk struktur og soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ved etablering av nye yngellokaliteter. NINA Rapport 2405. Norsk institutt for naturforskning.

Denne rapporten oppsummerer populasjonsstruktur hos spissnutefrosk (*Rana arvalis*) og uttesting av algesoppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) via hudsvaberprøver fra storsalamander (*Triturus cristatus*), småsalamander (*Lissotriton vulgaris*), nordpadde (*Bufo bufo*), buttsnutefrosk (*Rana temporaria*) og spissnutefrosk fra Vestby, Akershus. Bakgrunnen for denne rapporten er et ønske om en faglig vurdering av hvilken effekt utvidelse av Vestby Næringspark kan ha på bestanden av spissnutefrosk. Arealene hvor utvidelsen av Vestby Næringspark Ø er planlagt, fungerer i dag som funksjonsområde for de nevnte fem amfibiartene. Kommunen ønsker å kompensere med avbøtende tiltak for at amfibiartene som per i dag bruker Todamområdet, skal kunne opprettholde både bestandsstruktur og -størrelse etter en eventuell utvidelse av næringsparken. Aktuelle tiltak er å flytte voksne eller egg av amfibier til erstatningslokaliteter, etablere nye yngellokaliteter og eller forbedre landhabitatet på arealer som ikke blir berørt av en eventuell utvidelse av næringsparken. Dette krever kunnskap om både bestandsstørrelse og -struktur hos de amfibiartene som er mest truet av en eventuell nedbygging. I tillegg er det viktig å ha kunnskaper om forekomst av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), da dette vil ha betydning for eventuell flytting av dyr.

Bd er en algesopp i rekken Chytridiomycota, en av de mer primitive typene av sopp vi kjenner til i dag. Bd påfører amfibier infeksjonssykdommen chytridiomykose via zoo-sporer, da amfibier fungerer som vertskap for Bd og blir bærere av zoosporangier. Bd ble først påvist i Norge ved miljø-DNA-prøver i 2017 fra filtrerte prøver fra damvann i Drøbaksområdet, og er senere påvist i østre deler av Osloområdet, Nittedal og ned mot Moss. For å kartlegge mulig smitte i Vestby ble til sammen 59 individer fordelt på de fem amfibiartene som forekommer i Vestby, testet for Bd-smitte. Kun ett individ av nordpadde testet positivt. Selv om én positiv prøve av Bd tilsier lavt smittetrykk må allikevel hele området rundt Vestby Næringspark Ø betraktes som potensielt smittet med Bd, selv om antall reelt smittede individer trolig er veldig lav. Påvisning av Bd har medført at flytting av amfibier fra Todamsystemet og ned til Ødemørk ikke lenger er ønsket.

Spissnutefrosken er rødlistet som sårbar (VU) i Norge, og et av tiltakene for å bevare bestanden som per i dag gyter i Todammen og området rundt, kan være å flytte eggklaser til nærliggende dammer. Egg er trolig ikke smittet av Bd, men for å utelukke smitte i vannet ved transport bør vann og egg-klaser behandles med sopp-drepende midler for å unngå økt risiko for spredning av Bd-smitte.

Et alternativ kan også være å hente inn egg fra spissnutefrosk fra en bestand som ikke er smittet med Bd, og som ligger nær geografisk til Ødemørkdammene. For å undersøke om det eksisterer delpopulasjoner av spissnutefrosk i området, ble det samlet inn egg under gytetiden til spissnutefrosk våren 2023. For å unngå nært slektskap ble det samlet inn ett egg per eggklase, fordelt på ni lokasjoner som ble sendt til DNA-analyse. Etter genotyping av 66 individer på fire mikrosatelittmarkører ble det ikke påvist noen populasjonsstruktur i området. Det må dog understrekes at datasettet for genetisk variasjon er meget begrenset. Det at det heller ikke påvist struktur på tvers av E18, der vi forventer forskjeller, gjør at konklusjonen om ingen populasjonsstruktur trolig ville blitt endret ved bruk av et større datasett.

Annette Taugbøl, NINA Lillehammer, annette.taugbol@nina.no  
Jeroen van der Kooij, Naturformidling, konsekvensutredning og forskning, jvdtkooij@online.no  
Hege Brandsegg, NINA Trondheim, hege.brandsegg@nina.no  
Merethe Spets, NINA Trondheim, merethe.spets@nina.no  
Børre Dervo, NINA Oslo, borre.dervo@nina.no

# Innhold

<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Innhold</b> .....	<b>4</b>
<b>Forord</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>6</b>
1.1 Kort om soppen <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) .....	7
1.2 Forekomst av Bd i Norge.....	7
<b>2 Materialer og metoder</b> .....	<b>9</b>
2.1 Uttesting for Bd i området ved hudsvaberprøver fra amfibier .....	9
2.2 Uttesting av populasjonsstruktur hos spissnutefrosk .....	11
2.3 Mikrosatelitter .....	13
<b>3 Resultater med kommentarer</b> .....	<b>14</b>
3.1 Kun en Bd-positiv padde fra Todammen.....	14
3.2 Genetisk populasjonsstruktur hos spissnutefrosk.....	15
3.3 Kortfattet konklusjon .....	17
<b>4 Referanser</b> .....	<b>18</b>
<b>5 Vedlegg</b> .....	<b>20</b>
5.1 Vedlegg 1. Kart over alle lokalitetene.....	20
5.2 Vedlegg 2. Tabell over lokalitetene.....	21
5.3 Vedlegg 3. Behandlingsforslag.....	23
5.4 Kunnskapsoppsummering ved behandling av itraconazole.....	24

## Forord

Dette prosjektet er utført på oppdrag av Vestby kommune, og rapporten inngår som en av i alt fire utredninger i forbindelse med utvidelse av Vestby Næringspark Ø. Utredningene skal samlet gi et tilstrekkelig kunnskapsgrunnlag for gjennomføring av avbøtende tiltak som sikrer amfibiene i området. Denne rapporten beskriver en kartlegging av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) og anbefaler tiltak som kan gjennomføres for bevaring av amfibiene ved næringsparken. Videre beskriver rapporten undersøkelser som er gjennomført for å skaffe kunnskap om bestandsstrukturen til spissnutefrosken. Dette er den amfibiarten som er mest truet ved Vestby Næringspark Ø. Det er derfor viktig å gjennomføre tiltak som bevarer denne arten ved en eventuell utvidelse av næringsparken. Børre K. Dervo har vært prosjektleder, Jeroen van der Kooij har gjennomført det meste av feltarbeidet, mens Annette Taugbøl har hatt ansvaret for de genetiske undersøkelsene. Merethe Spets har stått for analysene av genetikprøvene. Alle takkes for innsatsen. Kontaktpersoner hos oppdragsgiver har vært Cathrine Sussane Torjussen og Ragnar Joakim Nese.

Lillehammer, januar 2024

Børre K. Dervo  
Prosjektleder

# 1 Innledning

Vestby kommune har i perioden fra 2019 til d.d. arbeidet med en reguleringsplan for utvidelse av Vestby Næringspark Øst. Innenfor planområdet ligger Todammen, hvor det er registrert storsalamander (*Triturus cristatus*), småsalamander (*Lissotriton vulgaris*), nordpadde (*Bufo bufo*), buttsnutefrosk (*Rana temporaria*) og spissnutefrosk (*Rana arvalis*). Todammen er en kunstig etablert dam, som ble laget som erstatning for «gamle Todammen» som lå innenfor det som i dag er Vestby næringspark Ø, og er omfattet av reguleringsplan for Vestby Næringspark Ø, vedtatt i 2009. I 2009, i etterkant av vedtatt plan, ble det oppdaget storsalamander i «Gamle Todammen». På bakgrunn av dette ble det satt i gang et arbeid med å etablere en erstatningsdam og to kunstige overvintringsplasser. Det ble flyttet salamander til den nye erstatningsdammen som i denne rapporten er henvisning til som «Todammen». Salamandere ble flyttet under vårvandringen i perioden 2011-2013. I etterkant av dette arbeidet har det etablert seg bestander av storsalamander, småsalamander, spissnutefrosk, buttsnutefrosk og padde i den nye Todammen.

Ved rullering av kommuneplanen ble det i kommuneplan for 2019-2030 foreslått å sette av områder til en utvidelse av Vestby Næringspark Ø. Fylkesmannen i Oslo og Akershus fremmet innsigelse til denne utvidelsen, med bakgrunn i at næringsområdet er vesentlig i strid med nasjonale jordverninteresser og ville komme i konflikt med naturverdier av nasjonal og vesentlige regionale interesser. Ved andregangsbehandling av kommuneplanen ble området redusert noe, slik at all dyrket og dyrkbar mark, samt gårdstunet på To gård, ble tatt ut av kommuneplanen. Innsigelsen ble imidlertid ikke imøtekommet i stor nok grad, og den ble sendt over til Kommunal- og moderniseringsdepartementet (KMD) for endelig behandling. Ved behandling i KMD ble området godkjent, men med en endret avgrensning.

I 2021 ble det varslet oppstart av planarbeidet for utvidelse av Vestby Næringspark Ø, i tråd med området avsatt i kommuneplanen. Da planforslaget lå ute til offentlig ettersyn fremmet Statsforvalteren i Oslo og Viken innsigelse til reguleringsplanen på nytt, med bakgrunn i at planforslaget ikke ivaretok hensynet til spissnutefrosk og storsalamander på en god nok måte. I planforslaget ble det foreslått å flytte amfibier fra Todammen til et erstatningsområde. Det som ikke fremgikk tydelig nok i planforslaget var hvordan dette skulle gjennomføres, og hvor amfibiene eventuelt skulle flyttes til.

Kommunen har i ettertid utredet området Ødemørk som lokalitet for flytting av amfibier. Her var det to dammer som Vestby kommune vurderte som egnet. I den ene Ødemørkdammen var det i artsobservasjoner registrert storsalamander, småsalamander og buttsnutefrosk. Våren 2022 ble det i tillegg gravd ut fire nye dammer på Ødemørk.

Statsforvalteren i Oslo og Viken påpekte spesielt manglende fokus på spissnutefrosken i planene til Vestby kommune. Spissnutefrosken ble i siste rødlistevurdering listet som *sårbar* (VU, Dervo m.fl. 2021). Dagens kunnskapsnivå er mangelfullt, både nasjonal status, og lokalt ved Todammen (Artsobservasjoner.no, Strand 2013, Nese og Torjussen 2023). Arten opptrer gjerne fåtallig i mindre lokaliteter og kan lett bli oversett i vanlige amfibieundersøkelser. Spissnutefrosken ligner buttsnutefrosken i mange ytre trekk, og artene kan også forveksles.

Bakgrunnen for dette oppdraget var at Vestby kommune ønsket å skaffe tilstrekkelig kunnskap om amfibiene generelt, og spissnutefrosken spesielt, for å kunne forberede flytting av amfibier fra Todammen til Ødemørkområdet våren 2023. Det ble derfor planlagt både kartlegging av forekomst og genetikundersøkelse av spissnutefrosk, og nye tester av eventuell forekomst av sopp *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Tidligere tester av Bd har vært negative. Dette prosjektet skulle beskrive både populasjonsstruktur for spissnutefrosken ved Todammenområdet, og status for Bd. Etter årets yngleperiode skulle denne og andre undersøkelser gi et tilstrekkelig grunnlag for hvilke forvaltningstiltak som var nødvendig for å sikre både bestand og den genetiske variasjonen i området ved næringsparken for spissnutefrosken, og tilstrekkelig kunnskap for å ivareta de andre amfibieartene.



## 1.1 Kort om soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

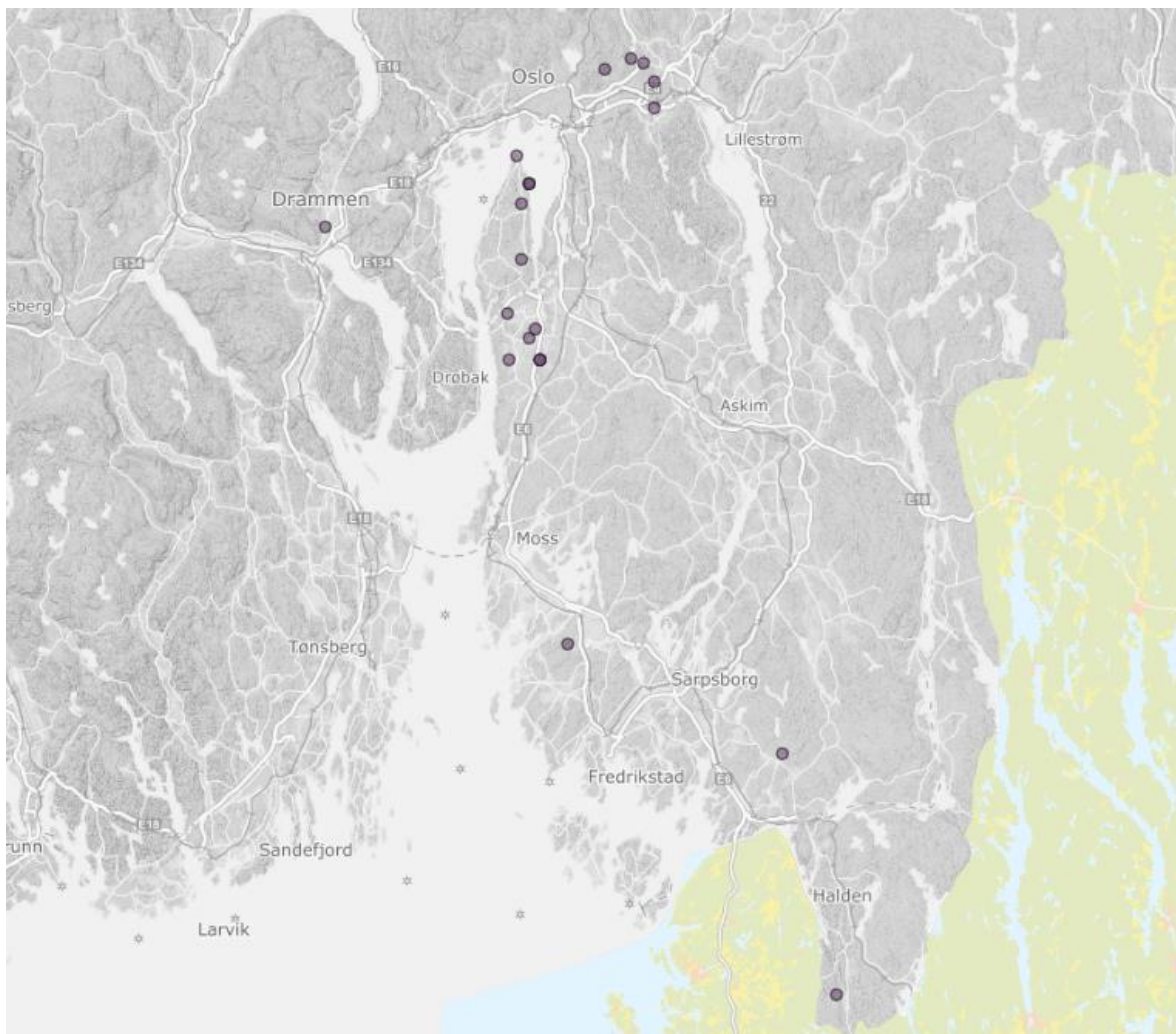
*Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) er en algesopp i rekken Chytridiomycota, en av de mer primitive typene av sopp vi kjenner til i dag. Bd påfører amfibier infeksjonssykdommen chytridiomykose via zoo-sporer da amfibier fungerer som vert for Bd og blir bærere av zoosporangier. Selv om chytridiomykose hos amfibier til nå har vært kjent fra ulike verdensdeler i snart 30 år, er det ennå relativt lite man vet om sykdomsforløpet hos ulike arter av amfibier. Sykdommen har ført til drastisk reduksjon i flere amfibiepopulasjoner i enkelte verdensdeler. Det er videre høy sannsynlighet for at det er store mørketall på dødelighet for ulike arter. Det foreligger få overlevelsesstudier av amfibier i deres naturlige habitat igjennom sesongen. Vi har per i dag undersøkt et meget begrenset geografisk område i Norge for smitte av Bd, og det er generelt begrenset publisert kunnskap om konsekvenser av smitte i naturlige populasjoner (**figur 1** viser positive Bd-funn frem til 2021). Fra forsøk i laboratorium på ulike froske- og paddearter er generelle funn at infiserte individer har lavere vekt (Kásler et al., 2022, Meurling et al., 2019), høyere metabolisme (Campbell et al., 2019), lavere nivå av immunbeskyttende stoffer (Cortazar-Chinarro et al., 2022; Meurling, 2019) og mindre utviklede kjønnsorganer (Campbell et al., 2019). Mer utfyllende bakgrunn om selve soppen kan leses i Taugbøl et al. (2017) og VKM (2019).

## 1.2 Forekomst av Bd i Norge

Soppen Bd ble først påvist i Norge i 2017, ved filtrering av miljø-DNA og bruk av artsspesifikke primere som gjenkjenner DNA fra den mikroskopiske soppen (Taugbøl et al. 2018). De første positive prøvene ble samlet inn fra salamanderdammer i Akershus (Taugbøl et al., 2017; Taugbøl et al., 2021). Videre kartlegging påviste kun storsalamander (*Triturus cristatus*) som vert, da ingen av svaberprøvene for småsalamander (*Lissotriton vulgaris*) fanget inn fra de påviste infiserte dammene var positive i 2018 (Taugbøl et al., 2019). For storsalamander varierte prevalensen (antall smittede dyr i forhold til totalt testet) forholdsvis mye mellom dammene, fra 14 % smitte i Tokerud til 80 % smitte fra dyr ved dammen ved Røer gård (Taugbøl et al., 2019). Påvisning av smitte har senere blitt gjort i dammer som kun brukes av småsalamander (Taugbøl et al. upubliserte data).

Dammene som hadde Bd-positive individer fra resultater fra svaberprøver ga ikke alltid positive utslag på Bd fra vannprøver. For sikrere påvisning av Bd (lavere mulighet for falske negative), har det vist seg nødvendig med innsamling av svaberprøver fra dyr (Taugbøl et al., 2019). At en art ikke blir påvist fra vannprøvene, selv om den er tilstede i miljøet, kan ha flere årsaker. Innsamlingstidspunkt, temperatur i vannet, tetthet av arten man ønsker å teste for, mengde filtrert vann, filtertype og metoder på labben kan påvirke resultatet. Med Bd som eksempel, vil lav smitte på dyrenes hud, som sannsynligvis var tilfelle for storsalamanderprøvene i 2018 (Taugbøl et al., 2019), også gi færre DNA-molekyler fra Bd i vannet. Dette gir større muligheter for falske negative resultater ved filtrering av vannprøver.

I den første fasen av testing for Bd, ble potensiell forekomst i Norge mer eller mindre tilfeldig testet på vannprøver filtrert fra salamanderdammer. Disse prøvene skulle i utgangspunktet testes for bruk av bestandsestimering av storsalamander og småsalamander (Taugbøl et al. 2018). Hvis soppen hadde vært «målet» med innsamlingen, ville prioriterte arter for uttesting vært frosk og padde. Bd har trolig oppstått med frosk som vert. Erfaringer fra Sverige er at nordpadda er den amfibearten i Norden med dårligst overlevelse etter smitte av Bd. I Osloomarka i 2021 ble det samlet inn totalt 70 individuelle svaberprøver på nordpadde fra 8 dammer. Totalt testet 32 individer positivt på Bd, fra fem ulike dammer (Taugbøl et al. 2023). Prevalensen av smittede dyr var mellom 40 (Vesletjernet) og 100 % (Svartkulp og Froskedammen ved Kjelsås). Dette er første gang det er påvist Bd på nordpadde i Norge, og paddeprøver samlet inn i 2022 identifiserte ytterligere to dammer i Osloomarka som infiserte (Taugbøl et al., upubliserte data). Bd er enda ikke påvist på frosk i Norge.



**Figur 1.** Positive Bd-funn i Norge frem mot 2021. Negative funn er ikke tatt med da ulike prøveinnsamling som er brukt har store feilmarginer og høy risiko for falske negative. Kart hentet fra Artsdatabanken.no.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Uttesting for Bd i området ved hudsvaberprøver fra amfibier

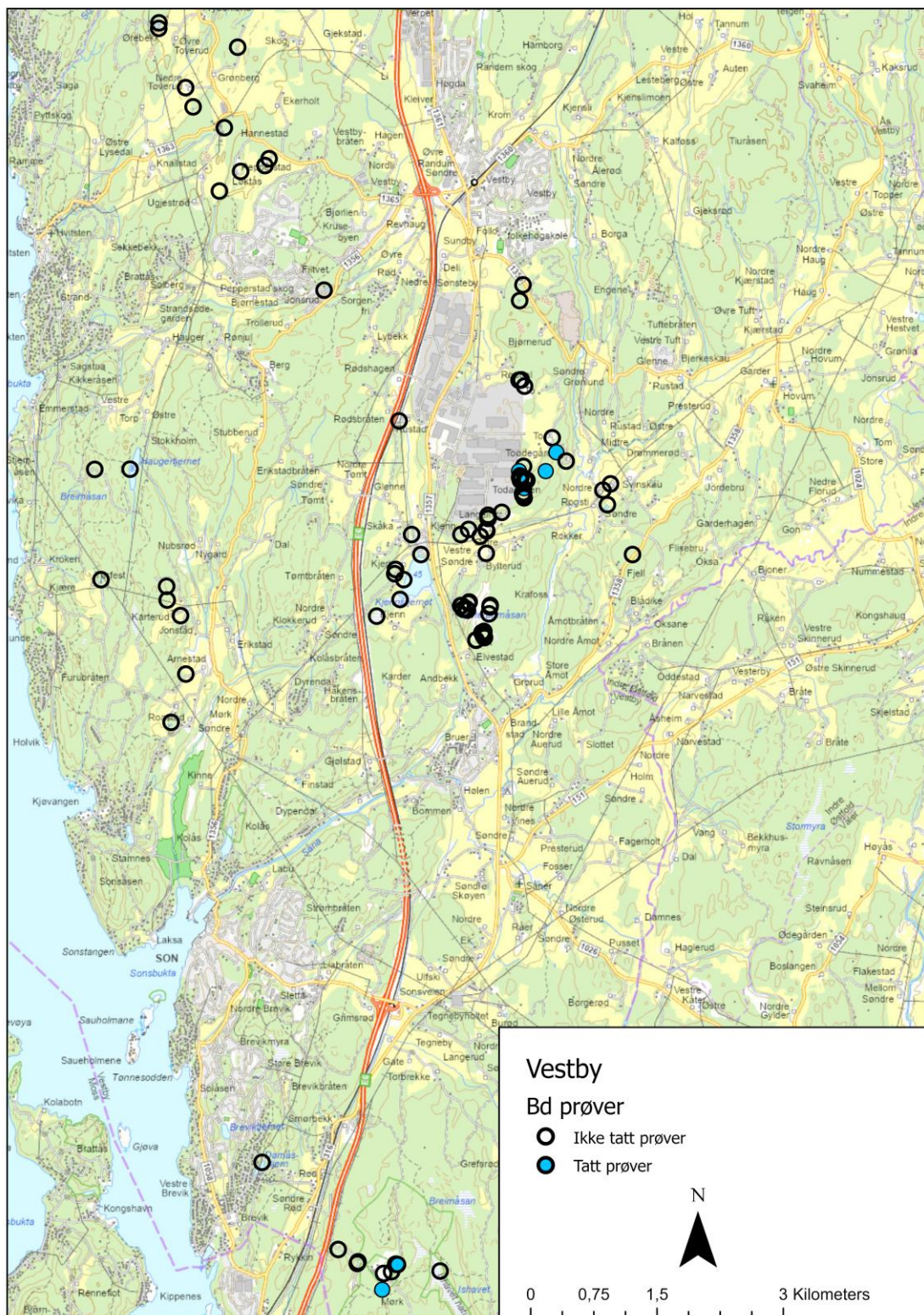
Våren 2023 ble det samlet inn 59 svaberprøver fra huden til amfibier for testing av Bd i 8 dammer eller pytter fordelt på 3 individer av spissnutefrosk, 9 individer av buttsnutefrosk, 6 individer av nordpadde, 3 individer av småsalamander og 38 individer av storsalamander i tidsrommet 17. april-11. mai (**tabell 1**). Geografisk fordelte det seg på 11 prøver fra tundammen på To gård (B4), 12 prøver i skogsdammen på To gård (B5), 28 prøver fra to dammer ved Ødemørk (F4 og F8) og 15 prøver fra Todamområdet (B7, B9, B10 og B12). **Figur 2** viser plassering av lokalitetene for prøvetaking av Bd. Prøvene ble sendt til NINAGEN for DNA-ekstraksjon og uttesting av artsmarkør for Bd, som beskrevet i Taugbøl et al. (2023). Nøyaktig nummerering og koordinater for hver lokalitet finnes i **vedlegg 5.2**.

**Tabell 1.** Oversikt over antall prøver fordelt på lokaliteter og arter som ble samlet inn for testing av forekomst av *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ved Vestby Næringspark Ø og Ødemørk. Med Todamområdet menes Todammen erstatningsdam og nærliggende temporære dammer innenfor en radius på ca. 300 m (lokaliteter berørt av planlagt utvidelse av næringsparken). Kart over plassering vist i **figur 2** og oversikt over alle lokalitetene i prosjektet i **vedlegg 5.2**.

Lokalitet	ID	Spissnute- frosk	Buttsnute- frosk	Nord- padde	Småsala- mander	Storsala- mander
Todammen	B7	3	0	3	1	2
To dam, kilden	B9	0	0	1	0	0
To dam, hjulspor N1	B10	0	0	1	0	1
To dam, hjulspor N2	B11	0	2	1	0	0
To S tundam	B4	0	0	0	0	11
To S, skogsdam	B5	0	0	0	0	12
Ødemørk II	F4	0	0	0	2	12
Ødemørk beite nord gammel	F8	0	7	0	0	0
Sum		3	9	6	3	38



Foto: Buttsnutefrosk hann frå Todammen (B7) klar for strykeprøve. © Jeroen van der Kooij.



**Figur 2.** Kart over alle innsamlingslokalitetene, hvor dammene med svaberprøver fra amfibier testet for Bd er merket i blått og åpne sirkler er øvrige lokaliteter i prosjektet undersøkt for forekomst av frosk uten innsamling av svaberprøver. Oversikt over innsamlede lokaliteter er lagt ved som vedlegg 5.2.

## 2.2 Uttesting av populasjonsstruktur hos spissnutefrosk

For å avdekke eventuell populasjonsstruktur hos spissnutefrosk i området rundt Todamsystemet ble det samlet inn enkeltegg fra eggklaser fra totalt 207 klaser fordelt på 27 dammer og pytter. **Figur 3** viser plassering av lokalitetene. Eggene ble lagt på 96 % etanol og oppbevart i romtemperatur. For å holde kostnadene nede ble det gjort et utvalg på 94 prøver fra 17 dammer som ble ekstrahert for DNA og genotypet for fire mikrosatelitt-markører på NINAGEN (se **delkapittel 2.3.** for mer informasjon om mikrosatelitter).

Det er brukt mikrosatelitter på spissnutefrosk før, men det er få publiserte primer-sekvenser. I dette studiet ble det testet ut ni publiserte markører fra spissnutefrosk (Richter-Boix et al. (2011)). Av de ni markørene var det kun fire som kunne brukes: RCIDII (6 alleler), Recalq (3 alleler), RlaCa41 (4 alleler) og RC08604 (4 alleler). Eggene fra 94 prøver som ble genotypet fordelte seg over populasjonene (sammenslåtte lokalitetsnavn) som vist i **tabell 2.**

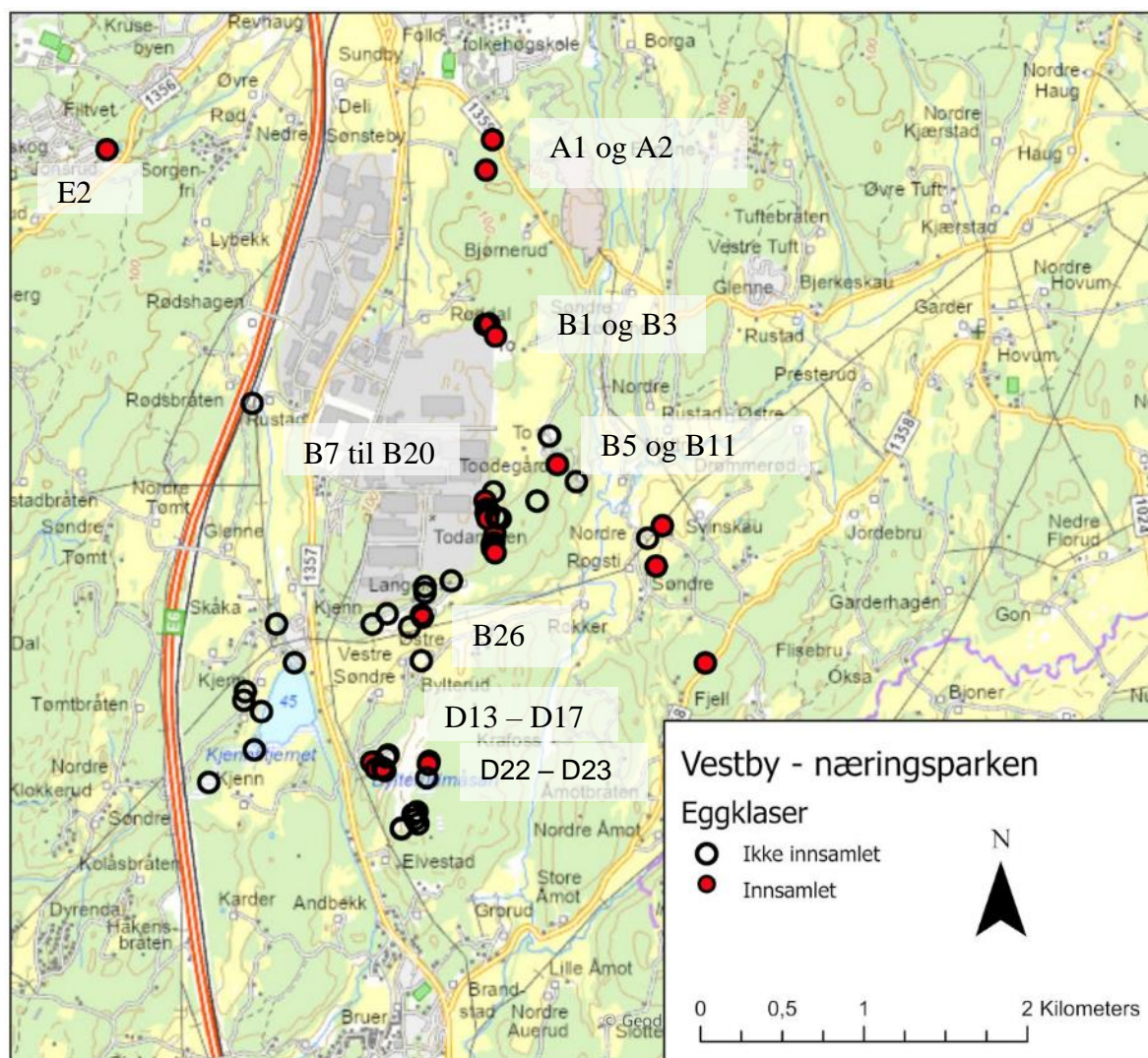
**Tabell 2.** Fordeling av individene av spissnutefrosk som ble genotypet fordelt på lokaliteter eller lokalitetskomplekser med Lok\_ID og antall individer.

Sammenslåtte lokaliteter	Lok_ID	Antall individer
Garderveien	A1 og A2	8
Todam kompleks skog	B11 og B5	10
To dam	B7 til B22	16
1NS	B1 og B3	14
Langli nedre	B26	3
Søndre Roksti	D11	4
Bylterudmåsan (BylterudM)	D22 og D23	7
Rokerveien	D14, D15, D16, D17	16
Moradammen	E2	8
Øvre Roastad skog	E3	8
Sum		94



**Foto:** Eggklaser til spissnutefrosk ved Øvre Roastad skog (E3). På hver klase ligger det et eppendorfrør med et egg opp i. © Jeroen van der Kooij.

Genotypene ble lest in i R og analysert ved hjelp av pakken «Adegenet». Ved gjennomkjøring ble enkelte individer mistenkt å være buttsnutefrosk, og alle 94 prøvene ble derfor testet med en artstest (genetisk artsmarkør) for å sikre at det kun var spissnutefrosk i datamaterialet. Artstesten avdekket at 28 prøver var fra buttsnutefrosk, og antall individer per populasjon ble dermed redusert for enkelte innsamlingslokaliteter, eller helt utelukket, som for Langli nedre (B26) og To-dam kilden (B9). For å øke antallet individer per geografisk område ble enkelte dammer innenfor korte geografiske avstander slått sammen til et område (**Figur 3**).



**Figur 3.** Kart over besøkte lokaliteter og innsamlingslokalitetene for froskeegg (merket rød). Navn og koordinater for hver lokalitet i vedlegg 5.2. Øvre Roastad skog (E3) ligger utenfor kartutsnittet (se vedlegg 5.1). Innsamlingslokaliteter ble slått sammen og gitt lokalitetsnavn for de genetiske analysene. B1 og B3 er slått sammen til 1NS. D22 til D23 er slått sammen til BylterudM. A1 og A2 er slått sammen til Garderveien. Alle lokalitetene fra D13 til D17 er slått sammen til Rokerveien. B5 og B11 er slått sammen til Todam kompl Skog. Og alle lokalitetene fra B7, B9, B10, B12-B14, B17-B20 er slått sammen til To dam.

## 2.3 Mikrosatelitter

Mikrosatelitter har vært mye brukt i populasjonsgenetikk, og var lenge den vanligste markøren i genetiske studier. Mikrosatelitter er repeterende sekvenser som består av 2-6 basepar som ligger på rekke og rad i DNAet, der antall repeterende sekvenser til sammen utgjør en lengde, som igjen utgjør ett «allel» for et individ. En bestemt mikrosatellitt kalles et locus, og et locus er polymorft om det har flere enn ett allel (ikke-polymorfe locus er ikke informative i denne sammenheng). Et individ har to alleler for hver mikrosatellitt (ett fra far og ett fra mor), der individet er homozygot hvis det har to like alleler (av lik lengde), og heterozygot hvis det har to ulike alleler. Mikrosatelitter er informative ved at de har høye mutasjonsrater, som gjør at de ofte er veldig variable. Ved at et mikrosatellitt-locus har mange alleler vil ulike populasjoner som regel ha ulike frekvenser av de ulike allelene. Mikrosatellitene kan være nøytrale (ikke under seleksjon), under seleksjon (ikke nøytrale og blir da regnet som et «quantitative trait locus»; QTL), og de kan ligge inne i både exon (kodes til gener) og intron (kodes ikke til gener da de klippes vekk) av gener. I populasjonsgenetikk er det en fordel om markørene er nøytrale (ikke under seleksjon), da dette kan gi informasjon om genflyt og andre økologiske problemstillinger.

Mikrosatelitter har også en del ulemper. Den høye mutasjonsraten, en av faktorene som gjør mikrosatelitter attraktive i utgangspunktet, fører også til utfordringer når en kun bruker lengden på allelene, og allelfrekvensene, til statistiske utregninger. Såkalt «homoplasy» oppstår når to individer med ulikt opphav muterer til det samme allelet og slik blir identiske i tilstand, men ikke slektskap. konsekvensene av homoplasy er at allel variasjonen for populasjonen bli lavere, og en kan ende opp med å underestimere populasjons forskjeller. Et annet problem med mikrosatelitter er såkalte «null-alleler»; alleler som ikke amplifiserer i polymerase chain reaction'en (PCRen). Null alleler reduserer derfor gen-diversiteten, som igjen kan overestimere eller underestimere populasjonsforskjeller. Mutasjonsraten for hver mikrosatellitt er også ulik for ulike arter og kjønn, mellom genomiske områder, repetisjonslengden av (det kan virke som det er en øvre grense for hvor lan en mikrosatellitt kan være) og hvilke nucleotider som repetisjonssekvensen består. Dette gjør det utfordrende å lage statistiske modeller for bruk i beregninger av populasjonsgenetikk.



**Foto:** Egg-klaser fra spissnutefrosk der den juvenile larven kan sees inne i eggeskallet. Hvite egg er dekket av muggsopp og er døde. © Jeroen van der Kooij.

## 3 Resultater med kommentarer

### 3.1 Kun en Bd-positiv padde fra Todammen

I forbindelse med lekkesongen for amfibier i 2023 ble det samlet inn totalt 59 svaberprøver fra ni dammer for genetisk testing av Bd; seks prøver fra nordpadde, ni fra buttsnutefrosk, tre fra spissnutefrosk, 38 prøver fra storsalamander og tre prøver fra småsalamander. Resultatene viste at kun en prøve innsamlet fra nordpadde fra Todammen (B7) slo ut som positiv for Bd. Dette viser at Bd eksisterer i området, men sannsynligvis i lavt omfang. Det må allikevel påpekes at prøveantallet for de ulike amfibiartene, med unntak av storsalamander (**tabell 1**) er forholdsvis lavt. Per i dag er Bd påvist kun på storsalamander og nordpadde i Norge. Det er også viktig å være klar over at svaberprøver kan ha høy frekvens av falske negativer (falske negativer: at dyret er smittet, men prøven viser negativ smitte), spesielt ved lavt smittetrykk. I et studie av Taugbøl (2024) ble det funnet at 66 % av testene fra hudsvaber samlet inn fra smittede nordpadder ikke slo negativt ut for Bd (Taugbøl, 2024).

I utgangspunktet var et alternativ å etablere nye og restaurere eksisterende amfibielokaliteter ved Ødemørk, som erstatning for en eventuell utvidelse av Vestby Næringspark Ø. Da ville voksne individer og/eller egg kunne flyttes fra Todammen til dette erstatningsområdet. Det ble derfor samlet inn prøver til uttesting av Bd fra nærliggende områder til Todamkomplekset; To gårdsdam (B7): 11 prøver (samtlige fra storsalamander); To skogsdam (B5): 12 prøver (samtlige fra storsalamander), som alle var negative. Videre ble det også samlet inn prøver til uttesting fra to ulike dammer ved Ødemørk (F4 og F8): 14 prøver fra F8 (12 fra storsalamander, 2 fra småsalamander), 7 prøver fra (F4) (samtlige fra buttsnutefrosk), som alle var negative for Bd, noe som indikerer ingen til potensiell lav prevalens også for et større område. Se **vedlegg 5.1** for kart over lokalitetene, og **vedlegg 5.2** for navn og koordinater. Påvisningen av Bd i Todammen (B7) gjør allikevel flytting av amfibier til Ødemørk uaktuelt da dette kan spre Bd til nye områder som per i dag er smittefrie. Flytting av egg kan være en mulighet hvis eggene behandles (**vedlegg 5.3**). Det er per i dag ikke publisert smitte av Bd på amfibi-egg, men smitte av Bd før klekking har imidlertid vist seg å gi høyere dødelighet hos tre undersøkte Amerikanske froskearter (Urbina et al. 2021). Det kan derfor se ut til at embryoene kan smittes, men med så lave start konsentrasjoner at selve smitten kan være vanskelig å påvise ved genetiske metoder.

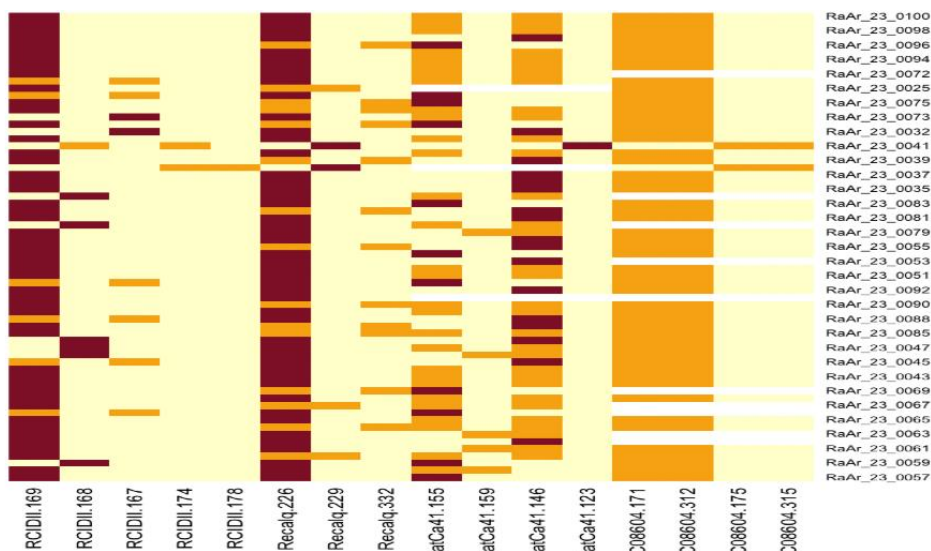
Vanskelig påvisning av Bd vil også gjelde for egg. For å redusere muligheten for Bd-smitte også ved flytting av egg bør de derfor behandles med soppreduserende middel. Det er videre viktig å understreke at all behandling kan påføre dyr stress, og at det derfor sannsynligvis er mer gunstig å behandle egg fremfor nyklekte larver. Det foreligger imidlertid lite forskningsresultater på behandling av egg i forhold til andre livsstadier per i dag. Foreslått prosedyre for eventuell behandling av egg ved forflytning er vedlagt som **vedlegg 5.3**, sammen med en kunnskapsoppsummering om behandlingen.

Bd er en sykdom som har ført til populasjonsnedgang hos amfibier i store deler av verden. Per i dag er det liten til ingen overvåkning av amfibiepopulasjoner i Norge, og det er derfor ikke mulig å utelukke negative arts- og populasjonseffekter av infeksjonen. Gjennom den overvåkingen som er gjennomført er det til nå ingen indikasjon på negative populasjonseffekter som skyldes Bd. Eksperimentelle undersøkelser viser også dødelighet opp mot 88 % ved overvintring av Bd-infiserte individer (Wetsch et al., 2022). Dette tilsier at det kan være «skjult» dødelighet, for eksempel ved lavere overlevelse igjennom vinteren. Eventuelle smitteeffekter må også sees i sammenheng med store naturlige svingninger som er vanlig i amfibiepopulasjoner, og det vil derfor være nødvendig å overvåke både smittede og friske populasjoner over tid for eventuelt å dokumentere effekten av Bd-smitte (Dervo et al., 2017).

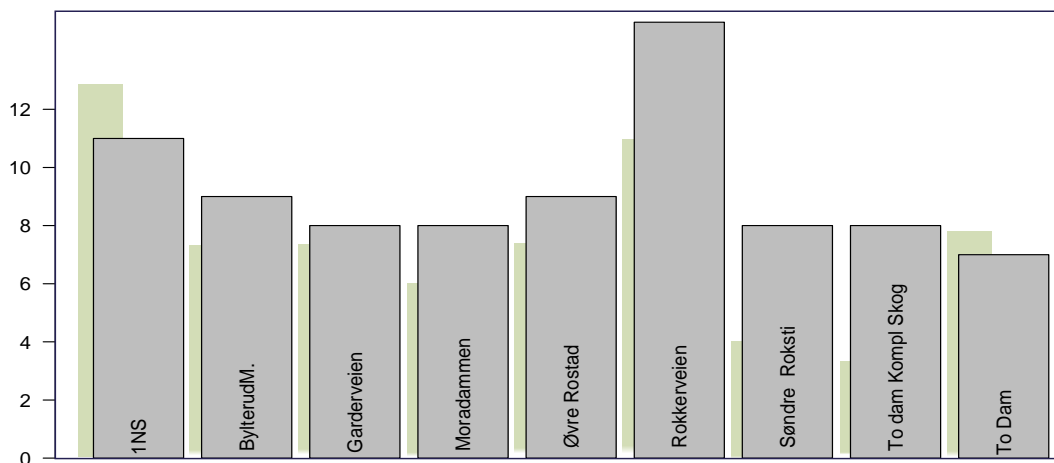


### 3.2 Genetisk populasjonsstruktur hos spissnutefrosk

Det ble sendt 94 prøver til genotyping, der resultatene viste at det ble nødvendig med en artstest for å skille mellom spissnutefrosk og buttsnutefrosk. Etter å ha ekskludert 28 buttsnutefrosk fra datasettet ble 66 spissnutefrosk genotypet for fire markører. Resultatene viste forholdsvis liten variasjon i antall alleler for markørene (**figur 4**). Flere av individene hadde identiske alleler for samtlige markører (**figur 4**), uavhengig av innsamlingssted, noe som dermed gav lav oppløsning (**figur 4, 5,6**). **Resultatene som diskuteres videre har derfor høy usikkerhet.**

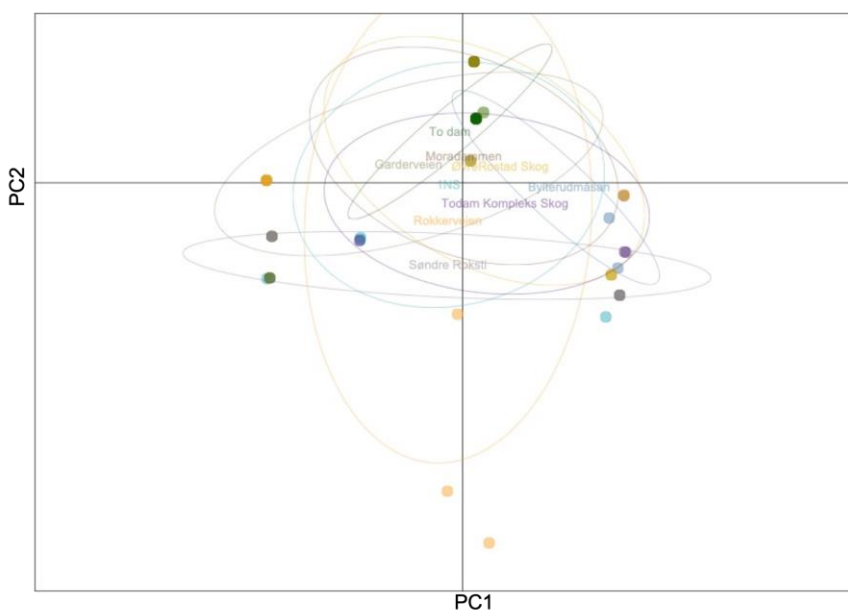


**Figur 4.** Oversikt over antall alleler per markør (x-aksen) fordelt over de 66 individene. Mørk rød farge indikerer at individet har to like alleler (homozygot for markøren), mørk gul farge indikerer ett allel (heterozygot for markøren), lys gul farge indikerer at individet har data for markøren, men det er ikke dette allelet og hvit farge tilsier at markøren ikke har data. Som det fremkommer av figuren har for eksempel markøren RCIDII fire ulike allel (de fire kolonnene helt til venstre), men nesten alle individene er homozygote for allelet med lengde 169.

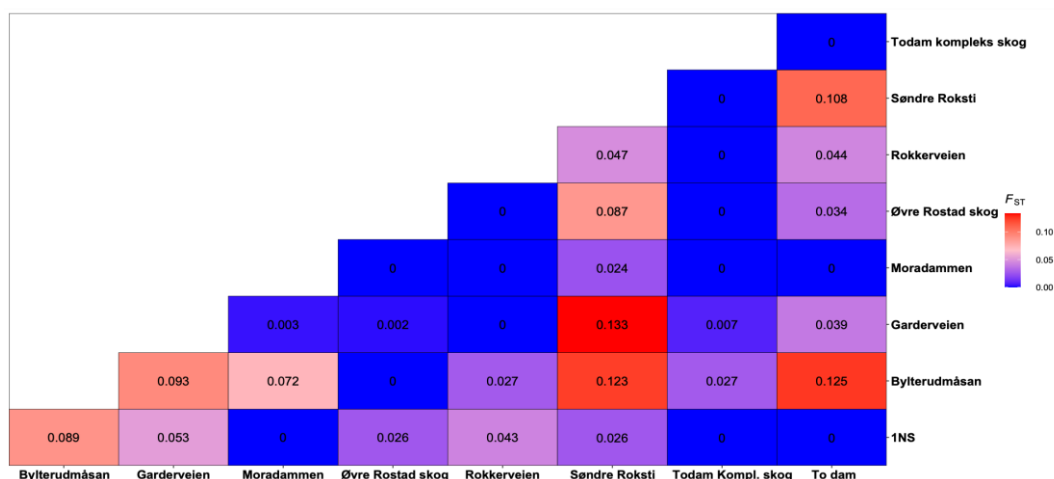


**Figur 5.** Antall microsatellitt-alleler for de ulike dammene og antall analyserte prøver (**figur 3**). Antall alleler per dam varierte fra 7-14 (grå søyler). Antallet er ikke korrigert for antall dyr som er genotypet per populasjon, vist som grønne søyler på samme y-akse. Antall alleler per markør varierte fra tre til seks. B1 og B3 er slått sammen til 1NS. D22 til D23 er slått sammen til BylterudM. A1 og A2 er slått sammen til Garderveien. Alle lokalitetene fra D13 til D17 er slått sammen til Rokkerveien. B5 og B11 er slått sammen til Todam kompl Skog. Og alle lokalitetene fra B7, B9, B10, B12-B14, B17-B20 er slått sammen til To dam.

Ut ifra geografisk plassering for lokalitetene (**figur 3**) ville vi forventet at Moradammen (E2) og Øvre Roastad skog (E3) skulle ha skilt seg mest ut fra de andre lokalitetene da de ligger på andre siden av E6, som er en meget trafikkert vei, noe som sannsynlig hadde skjedd ved bruk av flere markører. Fra PCA-plottet i **figur 6** ligger det genetiske gjennomsnittet til Moradammen (E2) tett på bl.a. Garderveien (A1 og A2), og ved analysing av fikseringsindeksen ( $F_{ST}$ -verdiene) er det kun to dammer som skiller seg noe fra de andre; Søndre Roksti (D11), som skiller seg noe fra Bylterudmåsan (D22 og D23) og Garderveien (A1 og A2) (**figur 7**). Dette resultatet er sannsynligvis en effekt av lavt antall analyserte individer for Søndre Roksti da det kun ble analysert fire spissnuteprøver fra denne lokaliteten (**figur 5**). Garderveien (A1 og A2) (nord-øst i kartet, **figur 3**) og Bylterudmåsan (D22 og D23) (Sør-øst i kartet, **figur 3**) var de to innsamlingslokalitetene som skilte seg mest fra hverandre, både i PCAen (de ligger lengst fra hverandre horisontalt, på PC1, **figur 4**) samt i  $F_{ST}$ -verdiene (**figur 7**). Dette kan indikere at det er en genetisk variasjon i området som ikke fanges opp godt med det tilgjengelige datasettet.



**Figur 6.** Resultater fra spissnute-genotypene. Øverste figur viser et Principle Coordinate Analysis (PCA)-plott, der hver prikk er et individ, farget etter innsamlingssted. På grunn av lav genetisk oppløselighet har mange individer identisk genotypemøster og ligger derfor over hverandre i plottet. Gjennomsnittet for hvert innsamlingssted er plottet som en firkant med stedsnavn.



**Figur 7.** Fikseringsindeksen ( $F_{ST}$ ) for de ulike innsamlingsdammene, der rødere farge tilsier høyere genetiske forskjeller mellom individene/populasjonene som er sammenlignet. Ved at antall genotypede individer per populasjon er få; antall markører og alleler per markør er få, er det usikkerhet i resultatene; om resultatene viser faktiske forskjeller eller tilfeldigheter. For lokalitetsbeskrivelse se **figur 5**.

### 3.3 Kortfattet konklusjon

Resultatet fra Bd-testingen og de genetiske undersøkelsen kan oppsummeres som følger:

- 1) Bd er påvist fra Todammen. Det gjør at amfibiene innenfor Todamkomplekset, dvs. arealet på den planlagte utvidelsen av Vestby Næringspark Ø og de undersøkte lokalitetene innenfor en radius på rundt 2 km, må anees som smittet av Bd.
- 2) Det er ikke aktuelt å flytte individer eller egg fra Todamkomplekset til Ødemørk.
- 3) Det kan være aktuelt å flytte froskeegg fra Todamområdet (dvs. lokalitetene B7 til B22) til nærliggende nye dammer som etableres, hvis man samtidig behandler eggene. Da er risikoen liten for å spre smitte til disse dammene. Eventuelt utsetting av spissnutefrosk til Ødemørk, må skje med egg fra andre områder som er dokumentert smittefrie i flytteåret, f.eks. Damåstjern (E1).
- 4) Tiltak i nærliggende dammer til Todammen er akseptabelt. En økt bestand gjennom habitforbedringer kan føre til at flere individer blir smittet i fremtiden og området kan da bli en større smitekilde til andre områder som i dag ikke er smittet. På den annen side så må området anses som smittet allerede. Vi tror at den beste forvaltningen av spissnutefrosken vil være å øke bæreevnen for arten i området rundt Vestby Næringspark Ø og at et eventuelt økt smittepress fra denne kilden vil fort veies opp av økt total bestandsstørrelse pga. habitatforbedringer.
- 5) Selv om den genetiske kartleggingen av populasjonsstruktur er begrenset, ser det ikke ut til at spissnutefrosken er delt opp i delpopulasjoner i og rundt Todammen (Todamområdet).
- 6) Det å øke kvaliteten på landhabitatene rundt Todamsystemet, sammen med nye yngledammer, vil kunne veie opp for reduksjon i bestanden som resultatet av en utvidelse av Vestby Næringspark Ø.
- 7) I utgangspunktet vil man ta vare på genressursene til spissnutefrosken ved å øke bestanden i nærområdet til Todammen.
- 8) Resultatene avdekket ikke noen populasjonsstruktur som bør hensyntas ved flytting av egg eller voksne amfibier mellom geografiske lokaliteter som er testet i dette studiet.
- 9) Eventuell utsetting av egg fra spissnutefrosk i Ødemørkdammene bør hentes fra en bestand som er dokumentert smittefri, og som ligger nærmere enn det Todamsystemet gjør.

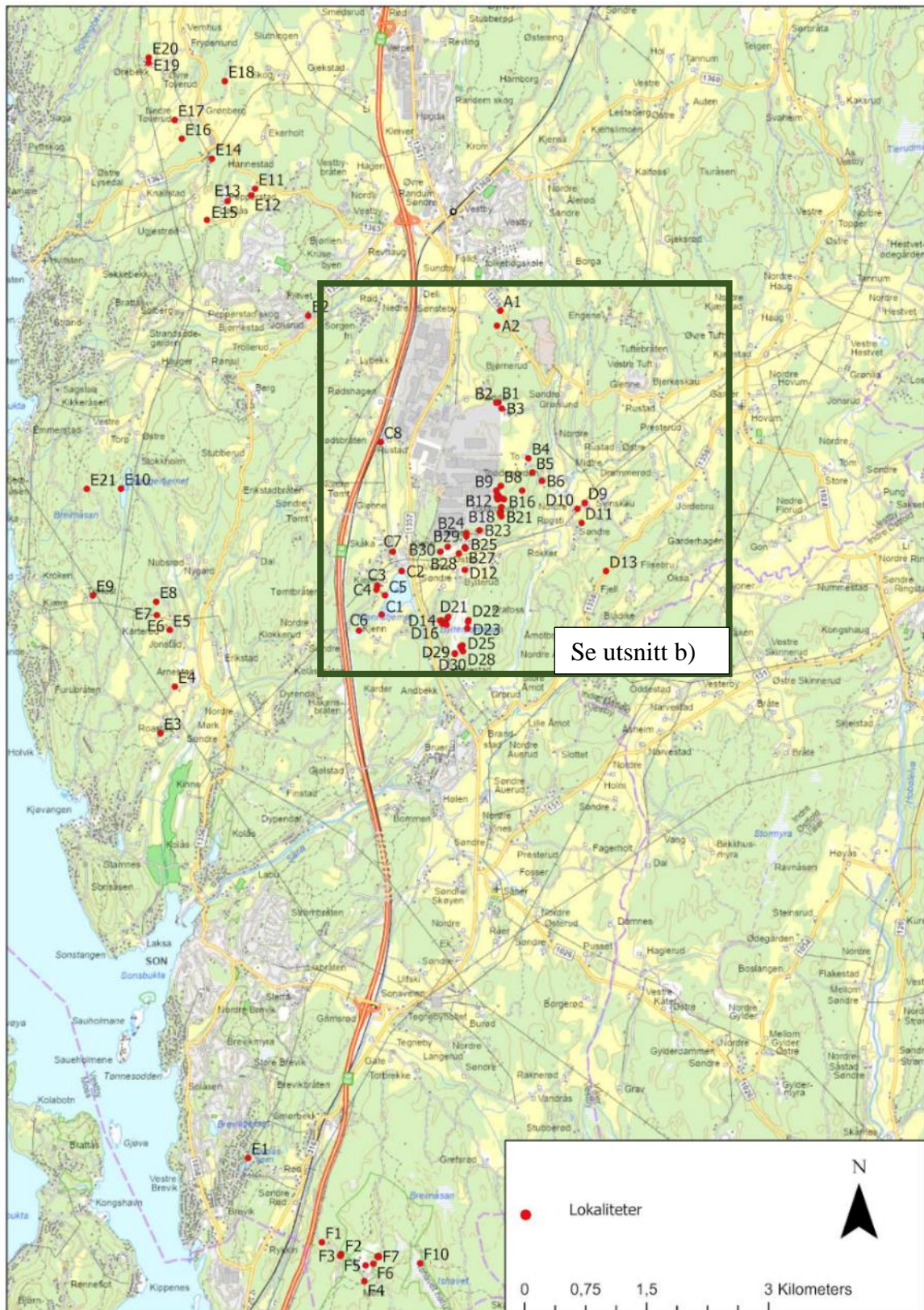
## 4 Referanser

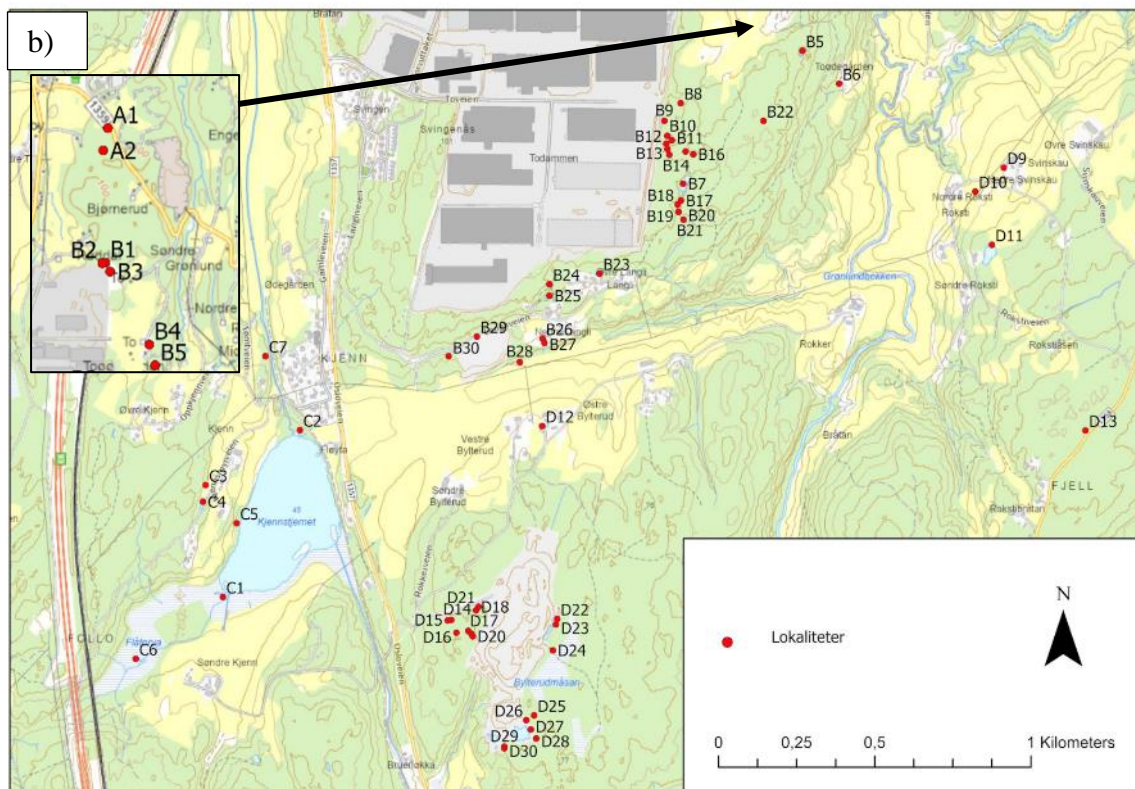
- Beebee TJC, Griffiths RA. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125:271-285.
- Bosch J, Sanchez-Tomé E, Fernández-Loras A, Oliver JA, Fisher MC, Garner TW. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biol Lett.* 2015 Nov;11(11):20150874.
- Branelly, LA (2014). Reduced itraconazole concentration and durations are successful in treating *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in amphibians. *J. Vis. Exp.*, 85 (2014), Article e51166.
- Campbell L, Bower DS, Clulow S, Stockwell M, Clulow J & Mahony M (2019). Interaction between temperature and sublethal infection with the amphibian chytrid fungus impacts a susceptible frog species. *Scientific Reports*, 9(1), 83.
- Cook, K, Pope, K, Cummings A, & Piovvia-Scott J (2022). In situ treatment of juvenile frogs for disease can reverse population declines. *Conservation Science and Practice*, 4(9), e12762.
- Cortazar-Chinarró M, Meurling S, Schroyens L, Siljestam M, Richter-Boix A, Laurila A, & Höglund J (2022). Major histocompatibility complex variation and haplotype associated survival in response to experimental infection of two Bd-GPL strains along a latitudinal gradient. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, Article 915271.
- Dervo BK, Bærum KM, Diserud OH (2017). Bruk av overvåkingsdata til beregning av bestandsutvikling hos storsalamander *Triturus cristatus* og småsalamander *Lissotriton vulgaris* i Norge. NINA-Rapport 1408. Norsk Institutt for Naturforskning.
- Garner TW, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis Aquat Organ.* 2009 Feb 25;83(3):257-60.
- Hudson MA, Young RP, Lopez J, Martin L, Fenton C, McCrear R, Griffiths RA, Adams S-L, Gray G, Garcia G, Cunningham AA (2016). In-situ itraconazole treatment improves survival rate during an amphibian chytridiomycosis epidemic. *Biological Conservation*, 195, 37-45.
- Kásler A, Ujszegi J, Holly D, Úveges B, Móricz ÁM, Herczeg D, & Hettyey A (2022). Metamorphic common toads keep chytrid infection under control, but at a cost. *Journal of Zoology*, 317(3), 159-169.
- Knapp RA, Joseph MB, Smith TC, Hegeman EE, Vredenburg VT, Erdman Jr JE, Boiano DM, Jani AJ, Briggs CJ. 2022. Effectiveness of antifungal treatments during chytridiomycosis epizootics in populations of an endangered frog. *PeerJ* 10:e12712.
- Meurling S. (2019). The response in native wildlife to an invading pathogen: Swedish amphibians and *Batrachochytrium dendrobatidis*. PhD degree, Uppsala University.
- Nichols DK, Lamirande EW (2000) Treatment of cutaneous chytridiomycosis in blue-and-yellow poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). *Proceedings of Workshop on Amphibian Disease*, Cairns, August 2000.
- Nichols DK, Lamirande EW (2001) Successful treatment of chytridiomycosis. *Froglog* 46.
- Pessier AP, Mendelson J. A (2009). manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. Apple Valley, MN: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group.
- Richter-Boix, A., Quintela, M., Segelbacher, G., & Laurila, A. (2011). Genetic analysis of differentiation among breeding ponds reveals a candidate gene for local adaptation in *Rana arvalis*. *Molecular ecology*, 20(8), 1582–1600.
- Taugbøl, A (2024). Metodeuttesting for skånsom DNA-innsamling fra amfibier. NINA-Rapport 2406. Norsk Institutt for Naturforskning.
- Taugbøl A, Bærum KM, Dervo BK, Fossøy F (2021). The first detection of the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Norway with no evidence of population declines for great crested and smooth newts based on modeling on traditional trapping data. *Environmental DNA*, 3, 760-768.
- Taugbøl A, Dervo BK, Bærum KM, Brandsegg H, Sivertsgård R, Ytrefhus B, Miller A, Fossøy F (2017). Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge. Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. NINA-Rapport 1399. Norsk Institutt for Naturforskning .

- Taugbøl A, Dervo BK, Brandsegg H, Fossøy F (2019). Analyser av miljø-DNA og strykeprøver for overvåking av soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Akershus. NINA-Rapport 1660. Norsk institutt for Naturforskning.
- Taugbøl A, Fossøy F, Dervo BK (2018). Bruk av miljø-DNA for deteksjon av arter. VANN 01.
- Taugbøl A, Strand D, van der Kooij J, Brandsegg H (2023) Første påvisning av *Batrachochytrium dendrobatidis* på Nordpadde i Norge. NINA Rapport 2255. Norsk institutt for Naturforskning.
- Urbina J, Bredeweg EM, Blaustein AR, Garcia TS. (2021). Direct and latent effects of pathogen exposure across Native and invasive amphibian life stages. *Front Vet Sci.* 2021 Oct 29;8:732993.
- VKM, Nielsen, A., Dolmen, D., Höglund, J., Kausrud, K., Malmstrøm, M., Taugbøl, A., & Vrålstad, T. (2019). Assessment of the risk to Norwegian biodiversity from the pathogenic fungi *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) and *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal). VKM Report.
- Wetsch O, Strasburg M, McQuigg J, Boone MD (2022) Is overwintering mortality driving enigmatic declines?
- Evaluating the impacts of trematodes and the amphibian chytrid fungus on an anuran from hatching through overwintering. *PLoS One*, 17, e0262561.

# 5 Vedlegg

## 5.1 Vedlegg 1. Kart over alle lokalitetene





## 5.2 Vedlegg 2. Tabell over lokalitetene.

**Tabell V2.** Undersøkte amfibielokaliteter i Vestby kommune med lokalitetsnavn, Lokalitets ID og UTM32. B1-B30 defineres som Todamområdet, mens B7-B22 som Todamsystemet (det som omfattes av planområdet).

Lokalitetsnavn	Lok_ID	UTM32Øst	UTM32Nord
Garderveien N-a	A1	599232	6607337
Garderveien S-a	A2	599193	6607151
1N	B1	599211	6606209
1NV	B2	599186	6606205
1S	B3	599251	6606135
To S, tundam	B4	599580	6605522
To S, skogsdam	B5	599629	6605348
To Ødegården III, skogkantdam	B6	599746	6605243
Todammen	B7	599247	6604923
To, nedstrøms nord	B8	599239	6605181
To dam, kilden	B9	599187	6605124
To dam, hjulspor N1	B10	599196	6605076
To dam, hjulspor N2	B11	599211	6605062
To dam, dreneringsgrøft V	B12	599193	6605051
To dam, hjulspor N3	B13	599197	6605034
To dam, hjulspor N4	B14	599203	6605016
To dam, dreneringsgrøft midtten	B15	599255	6605026
To dam, dreneringsgrøft Ø	B16	599279	6605017
To dam, dreneringsgrøft S I	B17	599240	6604869
To dam, dreneringsgrøft S II	B18	599229	6604856
To dam, dreneringsgrøft S III	B19	599232	6604833
To dam, hjulspor S1	B20	599248	6604808

**Tabell V3 fortsettelse.** Undersøkte amfibielokaliteter i Vestby kommune med lokalitetsnavn, Lokalitets ID og UTM32. B1-B30 defineres som Todamområdet, mens B7-B22 som Todamsystemet (det som omfattes av planområdet).

Lokalitetsnavn	Lok_ID	UTM32Øst	UTM32Nord
To dam, hjulspor S2	B21	599248	6604808
To dam, hjulspor N5	B22	599504	6605124
Langli Øvre, tundam	B23	598980	6604635
Langli Nedre 1 (N. Skogsdam)	B24	598819	6604601
Langli Nedre 2 (S. Skogsdam)	B25	598819	6604564
Langli Nedre 4 (N. Beitedam)	B26	598797	6604427
Langli Nedre 3 (S.beitedam)	B27	598803	6604413
Åkerdam nedenfor 14	B28	598724	6604352
Bekk/grøft langs veien	B29	598587	6604433
Hjulspor i hogstflate	B30	598496	6604371
Kjennstjernet sørvest	C1	597774	6603600
Kjennstjernet nord	C2	598020	6604134
Kjennsmyrveien Nordre	C3	597719	6603958
Kjennsmyrveien Søndre	C4	597710	6603905
Kjennsmyrveien Østre	C5	597818	6603836
Flåtorva	C6	597495	6603402
Tømtveien	C7	597910	6604371
Søndre Rustad	C8	597761	6605722
Nedre Svinskau	D9	600273	6604974
Nordre Roksti	D10	600182	6604898
Søndre Roksti	D11	600235	6604727
Østre Bulterud	D12	598796	6604147
Brandstadveien, veigrøft	D13	600535	6604133
Rokkerveien V-a	D14	598505	6603527
Rokkerveien V-b	D15	598493	6603525
Rokkerveien V-c	D16	598521	6603486
Rokkerveien V-d	D17	598559	6603491
Rokkerveien V-e	D18	598584	6603557
Rokkerveien V-f	D19	598569	6603483
Rokkerveien V-g	D20	598573	6603474
Rokkerveien V-h	D21	598593	6603569
Bylterudmåsan N-a	D22	598844	6603530
Bylterudmåsan N-b	D23	598840	6603512
Bylterudmåsan N-c	D24	598830	6603429
Bylterudmåsan SØ-a	D25	598770	6603221
Bylterudmåsan SØ-b	D26	598745	6603206
Bylterudmåsan SØ-c	D27	598759	6603176
Bylterudmåsan SØ-d	D28	598777	6603147
Bylterudmåsan S-a	D29	598675	6603121
Bylterudmåsan S-b	D30	598675	6603116
Damåstjern	E1	596133	6596914
Moradammen a	E2	596872	6607276
Øvre Roastad skog	E3	595055	6602141
Arnestad	E4	595230	6602713
Karterud	E5	595167	6603408
Karterud skog	E6	595007	6603593
karterud skog N	E7	595007	6603593
Karterud skog NN	E8	595002	6603757
Tørfest	E9	594222	6603835
Haugertjernet	E10	594568	6605148
Pepperstad gård på tunet	E11	596217	6608838



**Tabell V3 fortsettelse.** Undersøkte amfibielokaliteter i Vestby kommune med lokalitetsnavn, Lokalitets ID og UTM32. B1-B30 defineres som Todamområdet, mens B7-B22 som Todamsystemet (det som omfattes av planområdet).

Lokalitetsnavn	Lok_ID	UTM32Øst	UTM32Nord
Pepperstad gård syd for låven	E12	596170	6608755
Løktås	E13	595879	6608685
Haugtun	E14	595687	6609205
Nordre Ugjestrud	E15	595627	6608453
Nedre Toverud sør	E16	595315	6609453
Nedre Toverud gårdsdam	E17	595228	6609681
Grønberg	E18	595846	6610162
Ørebekk sør	E19	594907	6610386
Ørebekk nord	E20	594910	6610450
v for Haugertjern 200m n for Breimåsan	E21	594148	6605145
Ødemørk dam i hogstflate	F1	597038	6595878
Habitat Vest N	F2	597274	6595730
Habitat Vest S	F3	597265	6595711
Ødemørk II	F4	597562	6595399
Bekk i eng	F5	597578	6595594
Ødemørk beite syd	F6	597673	6595615
Ødemørk beite nord ny	F7	597723	6595703
Ødemørk beite nord gammel	F8	597733	6595710
Ødemørk grøft	F9	597743	6595698
Ishavet	F10	598248	6595620

### 5.3 Vedlegg 3. Behandlingsforslag

I utgangspunktet vet vi ikke om eggene som eventuelt skal flytte vil være smittet med Bd, men for å redusere muligheten for en eventuell nyetablering av Bd, foreslås behandling av eggene før utsetting i ny dam. En enkel fremgangsmåte kan være å behandle eggene én gang før flytting, slik at de utsettes for minst mulig belastning, samtidig som dette reduserer risikoen for Bd-smitte til nye dammer som eventuelt etableres. Samtidig, hvis man holder seg innenfor arealet som potensielt kan ha Bd-smittede amfibier, vil sannsynligheten for negative effekter av de avbøtende tiltakene som gjennomføres være svært små.

- I. Egg-klasene fiskes opp av vannet helst enkeltvis eller i små puljer av klaser
- II. Eggklasen i legges i en 10-L bønne med vann fra dammen de skal til
- III. Eggene/ larvene behandles daglig for 0,5 mg 1-1 itraconazole i fem minutter
- IV. Under behandling samles vannet fra oppholds bøtten i egnet beholder, tilsettes Virkon
- V. Vannprøver fra oppholds bøtten kan eventuelt fryses/ filtreres for senere testing av Bd
- VI. Bøtten vaskes lett og fylles med nytt vann fra dammen de skal til/ tilsvarende vann
- VII. Eggene settes tilbake i bøtten etter ferdig behandling (5 minutter)
- VIII. Behandlingen gjennomføres frem mot klekking
- IX. Eggene/larvene slippes fri i ny dam
- X. Alt utstyr rengjøres med Virkon S jmfør retningslinjer utarbeidet av NINA i samsvar med Fylkesmannen og Miljødirektoratet.

## 5.4 Kunnskapsoppsummering ved behandling av itraconazole

Tidligere utprøving med Itraconazole har gitt ulike resultater, både avhengig av hvilket livsstadie av amfibiet som er behandlet (larve, metamorfosert juvenil eller adult), samt om dyrene har blitt behandlet alene, eller i kombinasjon med behandling av dammen de kom fra. Samlet er bruk av Itraconazole allikevel den anbefalte behandlingen av Bd (Holden et al. 2014). Sammenfattet virker det bedre å behandle adulte dyr enn larver, men det er ingen som har testet effekter av behandling av egg. I dette oppsettet er det usikkert om Bd allerede er i området, men da eggene i utgangspunktet skal settes ut i ny-etablerte dammer vil sjansen for å eventuelt bli (re-)smittet av Bd være lav i de første årene, og behandling med svak dose ser ut til å gi kortvarige positive effekter også for juvenile som blir resmittet på senere tidspunkt. Nedenfor gis et kort sammendrag fra et utvalg studier.

Nichols & Lamirande (2000, 2001) behandlet juvenile pilgiftsfrosker med 0.01 % Itraconazole i en saltløsning på 0.6 PPT for fem minutters behandling over 8 og 11 dager, der begge utfallene resulterte i Bd-frie frosker. Garner et al. (2009) behandlet rumpetroll av Mallorcajordmorspadde *Alytes muletensis* i et randomisert oppsett med løsninger av itraconazole på 0.5, 1.0 og 1.5 mg l<sup>-1</sup> i daglige bad for fem minutter over 7, 14 og 21 dager. Samtlige rumpetroll ble Bd-frie etter behandling (testet en uke etter siste behandling), men rumpetrollene viste pigmentforandringer (de ble lysere). Garner et al. (2009) testet heller ikke for langtidseffekter av behandlingen, så det er uvisst om behandling ville gitt økt overlevelse i vill tilstand. Bosch et al. (2015) samlet inn rumpetroll av Mallorcajordmorspadde og behandlet de i daglige bad med 1.0 mg l<sup>-1</sup> i en uke før de returnerte dem tilbake til dammene ca. to uker etter behandling. Behandlingen gjorde rumpetrollene Bd-frie, men for dammene som ikke i tillegg var behandlet med Virkon S returnerte smitten raskt og det var ingen effekt av året etter. Ved gjentatt behandling av larver, i samsvar med ned-tapping og behandling av miljøet (nedvasking av steindammene som ikke har særlig mye vegetasjon) ble den ene tilstedeværende amfibie-arten på Mallorca (foreløpig) fri for Bd. Videre har det blitt rapportert om direkte dødelighet forårsaket behandling av itraconazole på adulte fjellgulbeinfrosk *Rana muscosa*, Europajordmorspadde *Alytes obstetricans* og Australiastripefrosk *Limnodynastes peronii* (Woodhams et al 2012), da etter høyere doser på 100 mg i fem minutter for 11 dager. Brannelly (2014) testet reduserte doser av itraconazole på nylig metamorfoserte Golfkystepadder *Incilius nebulifer*, og fant at doser ned mot 0.0025 %, og behandling i fem minutter daglig over seks dager fjernet Bd fra alle de dyrene, som hadde vært infisert i ca. to uker før behandlingsstart, men studiet fulgte ikke dyrene videre for eventuelle sen-effekter. Studier fra viltlevende amfibier viser også vekslende resultater etter behandling og tilbakeslipp til det opprinnelige habitatet. Hudson et al. (2016) fant økt overlevelse etter behandling av itraconazole, men med forholdsvis kortvarig effekt da behandlingsgruppen falt tilbake til kontrollgruppeverdier kort etter behandlingen ble avsluttet. Cook et al. (2022) fant at behandling av Bd-infiserte adulte Cascadefrosk *Rana cascadae* økte vinteroverlevelsen med ca. 300 % etter første behandling mot ikke-behandlede kontroller, og gjenfangstforsøk viste også at overlevelsen økte drastisk over flere år (Hardy et al., 2015, Cook et al. 2022). Knapp et al. (2022) fant at behandling av voksne Siera-Nevada-gulbeinfrosk *Rana sierrae* hadde en effekt, mens behandling av tidligere livsstadier kun hadde en ønsket effekt av lavere påvist Bd-dose og høyere overlevelse i opp mot to måneder etter behandling, da froskene som hadde vært behandlet som rumpetroll hadde tilsvarende doser som kontrollene etter ett år.



*Norsk institutt for naturforskning, NINA, er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og samspillet natur–samfunn.*

*NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø, Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driver NINA Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal, og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i Rogaland.*

*NINAs virksomhet omfatter både forskning og utredning, miljøovervåking, rådgivning og evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og erfaring med både naturvitere og samfunnsvitere i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene, samfunnets bruk av naturen og sammenhenger med de store drivkreftene i naturen.*

ISSN:1504-3312  
ISBN: 978-82-426-5213-3

## Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: [firmapost@nina.no](mailto:firmapost@nina.no)

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger